

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Paula Slatina

**Izraženost proteina obitelji *Dishevelled* u
posteljicama kod zastoja u rastu ploda**

Diplomski rad



Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Paula Slatina

**Izraženost proteina obitelji *Dishevelled* u
posteljicama kod zastoja u rastu ploda**

Diplomski rad



Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ljiljane Šerman i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

KRATICE KORIŠTENE U RADU:

APC	Protein adenomatozne polipoze kolona (engl. Adenomatous polyposis coli protein)
CamK II	Kalcij/kalmodulin ovisna kinaza II (engl. Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II)
Dkk	Protein <i>Dickkopf</i>
Dvl	Protein <i>Dishevelled</i>
EMT	Epitelno – mezenhimalna tranzicija
GSK3 β	Glikogen sintetaza kinaza 3 β
IUGR	Intrauterini zastoje u rastu (engl. Intrauterine growth restriction)
JNK	C-Jun N-terminalna kinaza
NEMO	Transkripcijski faktor NEMO (engl. Nuclear factor essential modulator)
PCP	Proces polariteta stanica (engl. Planar cell polarity)
PDZ domene	Zajednička struktura od 80-90 aminokiselina u proteinima PSD-95, Dlg i ZO-1
PKC	Protein kinaza C
PKG	Protein kinaza ovisna o cGMP (engl. cGMP-dependent protein kinase)
Rho	Član proteinske obitelji Rho (engl. Ras homologue gene family member)
RNA	Ribonukleinska kiselina
Rock	Protein kinaza Rock (engl. Rho associated coiled-coil containing protein kinase)
TORCH	Toksoplazmoza, rubela, citomegalovirus, herpes virus
Wnt	Wnt signalni put, prema engl. Wingless-related integration site

SADRŽAJ

1. SAŽETAK	
2. SUMMARY	
3. UVOD	1
3.1. Proteini obitelji <i>dishevelled</i> i Wnt signalni put.....	1
3.2. Intrauterini zastoj rasta ploda (IUGR)	3
4. HIPOTEZA	5
5. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	6
6. MATERIJALI I METODE	7
6.1. MATERIJALI	7
6.2. METODE	7
6.2.1. Uzorkovanje posteljice	7
6.2.2. Imunohistokemijska analiza	8
6.2.3. Priprema za imunohistokemiju.....	8
6.2.4. Imunohistokemijska obrada posteljice	9
6.2.5. Stereološka kvantitativna analiza	9
6.2.6. Statističke metode	10
7. REZULTATI	11
7.1. EKSPRESIJA DVL1 PROTEINA	11
7.1.1. Usporedba ekspresije DVL1 u posteljicama s IUGR i pozitivnoj kontroli	12
7.2. EKSPRESIJA DVL2 PROTEINA	13
7.2.1. Usporedba ekspresije DVL2 u posteljicama s IUGR i pozitivnoj kontroli	14
7.3. EKSPRESIJA DVL3 PROTEINA	16
7.3.1. Usporedba ekspresije DVL3 u posteljicama s IUGR i pozitivnoj kontroli	16
7.4. USPOREDBA EKSPRESIJE DVL1, DVL2, DVL3 U POSTELJICAMA S IUGR-OM I KONTROLNOJ SKUPINI TERMINSKIH POSTELJICA	18
8. RASPRAVA	20
9. ZAKLJUČCI	22
10. ZAHVALE	23
11. LITERATURA	24
12. ŽIVOTOPIS	29

1. SAŽETAK

Izraženost proteina obitelji *Dishevelled* u posteljicama kod zastoja u rastu ploda

Paula Slatina

Wnt signalni put igra važnu ulogu u razvoju placente i diferencijaciji ljudskog trofoblasta, a *Dishevelled* proteini su njegovi centralni medijatori koji omogućuju finu regulaciju aktivnosti ovog signalnog puta. Prema dosadašnjim spoznajama neuspješna invazija trofoblasta zapažena je u posteljicama fetusa sa zastojem u rastu (IUGR) i u hipertenzivnim poremećajima. Budući da *Dishevelled* proteini djeluju kao pozitivni regulatori Wnt signalnog puta, cilj ovog rada bio je ispitati ekspresiju DVL1, DVL2, DVL3 proteina u terminskim posteljicama sa zastojem u rastu (IUGR). Analizirane su ukupno 24 terminske posteljice od kojih je 15 bilo iz trudnoća sa zastojem u rastu, a 9 iz urednih trudnoća koje su služile kao kontrola. Napravljena je imunohistokemijska analiza sva tri antigena, a rezultati su kvantificirani stereološkom varijablom volumenske gustoće (V_v, mm^0). Statistički značajno manja ekspresija proteina DVL1, DVL2 i DVL3 detektirana je u terminskim posteljicama sa zastojem u rastu ploda u odnosu na zdrave terminske posteljice ($p < 0,05$; Mann Whitney). Dobiveni rezultati ukazuju na važnost porodice *Dishevelled* proteina u razvoju IUGR-a te podržavaju hipotezu plitke invazije u nastanku ove patologije trudnoće.

Ključne riječi : Wnt signalni put, *Dishevelled* proteini, DVL1, DVL2, DVL3, imunohistokemija, IUGR

2. SUMMARY

Expression of *dishevelled* protein family in the placenta in intrauterine growth restriction

Paula Slatina

Wnt signaling pathway plays an important role in the development of the placenta and the differentiation of trophoblast. Dishevelled proteins are the central mediators in this pathway which enable its fine regulation. According to previous knowledge, unsuccessful trophoblast invasion has been noticed in placentas of fetuses with intrauterine growth restriction (IUGR) and hypertensive disorders. Since Dishevelled proteins act as positive regulators of the Wnt signaling pathway, the aim of this study was to examine the expression of DVL1, DVL2 and DVL3 proteins in term placentas with IUGR. 24 term placentas have been analysed of which 15 were those from pregnancies with IUGR and 9 from normal pregnancies which served as a control. Immunohistochemical analysis was done on all three antigens and the results stereologically quantified using a variable for volume density (V_v , mm⁰). Statistically significant lower expression of proteins DVL1, DVL2 and DVL3 was detected in term placentas with IUGR in comparison to healthy term placentas ($p < 0,05$; Mann Whitney). The results show the importance of Dishevelled proteins in the formation of IUGR and support the hypothesis of shallow invasion being a factor in the pathogenesis of this condition.

Key words: Wnt signalling pathway, *Dishevelled* proteins, DVL1, DVL2, DVL3, immunohistochemistry, IUGR

3. UVOD

3.1. PROTEINI OBITELJI *DISHEVELLED* I WNT SIGNALNI PUT

Dishevelled proteini su sudionici Wnt signalnog puta koji se može aktivirati putem dva glavna molekularna mehanizma: kanonski i nekanonski. Kanonski Wnt signalni put aktivira se vezivanjem Wnt liganda za transmembranski receptor *Frizzled* [1]. Do danas je pronađeno 10 *Frizzled* receptora koji zajedno s koreceptorom LRP-5 ili LRP-6 (engl. low density lipoprotein receptor related protein) čine funkcionalnu cjelinu odnosno receptor za kanonski Wnt signalni put [2]. Kod aktivacije kanonskog Wnt signalnog puta, Wnt ligand se veže na *Frizzled* receptor i transducira signal na citoplazmatski protein Dvl, koji zauzvrat inhibira serin i/ili treonin kinazu nazvanu glikogen sintaza kinaza 3 β (engl. Glycogen synthase kinase 3 β ; GSK-3 β). Smanjena aktivnost GSK-3 β dovodi do inaktivacije i disocijacije kompleksa, razgradnje multiproteina koji rezultira akumulacijom i translokacijom citosolnog β -katenina u jezgru gdje potiče transkripciju gena odgovornih za rast i proliferaciju. β -katenin je ključni posrednik kanonskog Wnt signalnog puta, a nuklearni β -katenin je obilježje njegove aktivnosti [1,3-5]. U slučaju da izostane vezivanje Wnt liganda na receptor, razina novosintetiziranog β -katenina kontrolira se pomoću proteasomalnog degradacijskog kompleksa kojega zovemo 'destrukcijski kompleks' (Axin, APC, kazein Kinaza 1 i GSK-3 β) [1]. Međutim, Wnt može vezati *Frizzled* receptor neovisno o LRP koreceptoru, te pri tom aktivirati ili inhibirati kanonsku Wnt signalizaciju ovisno o receptoru. Tako se mogu inducirati nekanonski signalni putevi koji uključuju Ca²⁺ kao drugog glasnika [6-8]. Ligandi kao što su Wnt5a ili Wnt11 mogu djelovati preko Wnt/PCP (engl. planar cell polarity) i Wnt/Ca²⁺ signalnog puta vezanjem na *Frizzled* receptore i aktiviranjem Dvl neovisno o LRP-5 ili -6 [9]. Indukcija Wnt/PCP signalizacije uključuje G-proteini Rac (engl. Rho family of GTPases) i RhoA (engl. Ras homolog gene family, member A) te nizvodne efekte c-jun aminoterminalnu kinazu (engl. c-Jun N-terminal kinases; JNK) i Rho-pridruženu kinazu (engl. Rho-associated protein kinase; ROCK). Wnt/PCP signalizacija neophodna je za formiranje embrionalnih tkiva i organa, a njena aberantna aktivacija povezana je s metastaziranjem različitih vrsta karcinoma [10]. S druge strane, Wnt / Ca²⁺ signalizacija inhibira cGMP-ovisnu protein kinazu (PKG), koja

blokira otpuštanje Ca^{2+} u do tada neaktivnim stanicama, aktivira fosfolipazu C (PLC) i povisuje inozitol 1,4,5-trisfosfat (IP3) te na taj način potiče oslobađanje Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma [11]. Povećana koncentracija citosolnog Ca^{2+} stimulira aktivnost protein kinaze C (PKC), kalcij/kalmodulin-ovisne kinaze II (CamKII) i kalcineurina koji potiču tranlokaciju nuklearnog faktora κB (NF κB) i nuklearnog faktora aktiviranih T-stanica (NF-AT) iz citoplazme u jezgru [12-14]. Osim toga, akumulacija Ca^{2+} izazvana vezivanjem Wnt5a na receptor može stimulirati TGF- β -aktiviranu kinazu (engl. Transforming growth factor beta-activated kinase 1; TAK1) kao i nemo nalik kinazu (engl. nemo like kinase; NEMO). One mogu direktno blokirati aktivnost transkripcijskih faktora poput TCF (engl. T-Cell-Specific Transcription Factor 1) tako da ga fosforiliraju pa time antagoniziraju kanonski Wnt signalni put [15,16].

Wnt signalni put igra važnu ulogu u razvoju placente i diferencijaciji ljudskog trofoblasta. Nekoliko mRNA koje kodiraju za Wnt ligande i *Frizzled* receptore otkrivene su u ljudskoj terminskoj posteljici [17-21]. Osim toga, opažena je endometrijska ekspresija proteina Wnt3 i *Dickkopf-1* (Dkk1) koji inhibiraju kanonsku Wnt signalizaciju prekidanjem vezanja LRP-5/6 na Wnt / FZD kompleks, [22], što upućuje na parakrine mehanizme koji reguliraju implantaciju i/ili invaziju trofoblasta. Članovi obitelji TCF (TCF-3 i TCF-4) pretežno se ekspimiraju u invazivnom trofoblastu, a aktivacija kanonskog Wnt signalnog puta potiče migraciju i invaziju trofoblasta [23]. Dkk-1, također, blokira proliferaciju stanica trofoblasta u bazalnom dijelu kao i njegovu invaziju *in vitro* što ukazuje na to da bi kanonska Wnt signalizacija mogla biti regulirana autokrinim načinom [23]. Wnt signalizacija igra kritičnu ulogu u velikom nizu bioloških procesa, uključujući proliferaciju stanica, migraciju, uspostavljanje polariteta i samoobnavljanje matičnih stanica, dok je deregulacija signala Wnt povezana s razvojem raka [24-26].

Važni akteri ovog signalnog puta pripadaju obitelji *Dishevelled*, a znatno utječu na aktivnost destruktivnog kompleksa koji regulira citoplazmatsku koncentraciju β -katenina. Danas se smatra da je upravo ova skupina proteina centralni medijator u posredovanju između receptora (*Frizzled* i LRP) na površini stanice i stabilizacije β -katenina kako u invaziji trofoblasta tako i u invaziji tumorskih stanica.

Kod ljudi i miševa postoje tri *Dishevelled* homologa (Dvl1, 2 i 3), a građeni su od 750 aminokiselina i pokazuju visoki stupanj homologije što znači da su evolucijski konzervirani [27-31]. DVL proteini posjeduju tri konzervirane domene: aminoterminalnu DIX (Disheveled, Axin) domenu od 80 aminokiselina, središnju PDZ (Postsynaptic density 95, Discs Large, Zonula occludens-1) domenu od oko 90 aminokiselina i karboksiterminalnu DEP (Dvl, Egl-10, Pleckstrin) domenu od 80 aminokiselina [32].

3.2. INTRAUTERINI ZASTOJ RASTA PLODA (IUGR)

Wnt signalni put neophodan je za uspješnu placencijaciju pa je u ljudskoj posteljici izraženo nekoliko mRNA koje kodiraju za Wnt ligande. [17-21] Na temelju dosadašnjih istraživanja, čini se da kanonska Wnt signalizacija regulira kako invaziju tako i diferencijaciju stanica trofoblasta. U hidratiformnoj moli (CHM), pronađena je povišena lokalizacija defosforiliranog β -katenina u jezgrama trofoblasta što ukazuje na njihovu poremećenu aktivnost. [33]

Upravo proučavajući Wnt signalni put možemo vidjeti koliko sličnosti u invazivnosti pokazuju stanice trofoblasta i tumor. No, za razliku od tumorskih stanica, ponašanje trofoblasta je prostorno i vremenski strogo kontrolirano placentalnim i decidualnim proteinima. [34,35]

Greške u procesu invazije povezane su s različitim gestacijskim bolestima. Tako su plitka invazija decidualnog tkiva i nepotpuna transformacija spiralnih arterija obilježja preeklampsije i teškog intrauterinog zastoja u rastu. Za razliku od spomenutih patologija, hiperplazija trofoblasta s potencijalom maligne transformacije javlja se u kompletnoj hidatiformnoj moli (CHMs), dok je opsežna invazija zabilježena kod malignih koriokarcinoma. [36,37]

Intrauterini zastoj rasta (IUGR) je nemogućnost fetusa da postigne svoj genetski određeni potencijal rasta, zbog anatomske i/ili funkcionalne poremećaje. [38]. Rodna težina manja od 2 standardne devijacije (SD) za gestacijsku dob ili rodna masa manja od treće ili pete percentile za gestacijsku dob za određeno stanovništvo općenito se koristi za označavanje IUGR [39]. Razlikujemo dvije vrste zastoja u intrauterinom rastu: simetričan, ako su težina, duljina i opseg glave niski, i asimetričan, kada

su mozak i opseg glave unutar normalnih granica[38]. U većini slučajeva, IUGR je rezultat placentalne insuficijencije zbog poremećaja tijekom implantacije ili placentacije (diferencijacije trofoblasta, preobrazbe spiralnih arterija, razvoja i vaskularizacije posteljičnih resica) [40]. Oko 70% djece s porođajnom masom ispod 10. centile je potpuno zdravo te bez dodatne patologije pa se takav zastoј u rastu naziva idiopatskim [40]. Djeca rođena s niskom tjelesnom težinom češće oboljevaju od određenih bolesti kao što su šećerna bolest, ateroskleroza, respiratornih i kardiovaskularnih bolesti. [41] Studije na *knock out* miševima pokazale su važnu ulogu Wnt signalnog puta u razvoju posteljice [42-45] što ukazuje na moguću povezanost poremećenog prijenosa signala tim putem i proliferacije/difrencijacije trofoblasta i fetusa [46-49]. Stoga je cilj ovog rada bio analizirati jedanog od do sada u posteljici slabo istraženog markera invazije, proteine skupine *Dishevelled*, u ovoj patologiji trudnoće kako bi se dobio bolji uvid u fine regulatorne mehanizme koji tu invaziju kontroliraju.

4. HIPOTEZA

Posteljice iz patoloških terminskih trudnoća ploda sa zastojem u rastu (IUGR) imaju slabiju ekspresiju proteina obitelji *Dishevelled* nego posteljice iz zdravih terminskih trudnoća.

5. CILJEVI RADA

Opći cilj rada je ispitati izraženost proteina obitelji *Dishevelled*, jednog od biljega Wnt signalnog puta, u IUGR posteljicama i posteljicama iz normalnih terminskih trudnoća.

Specifični cilj rada je:

1. Ispitati izraženost DVL1 proteina u IUGR posteljicama i posteljicama iz zdravih terminskih trudnoća.
2. Ispitati izraženost DVL2 proteina u IUGR posteljicama i posteljicama iz zdravih terminskih trudnoća.
3. Ispitati izraženost DVL3 proteina u IUGR posteljicama i posteljicama iz zdravih terminskih trudnoća.

6. MATERIJALI I METODE

6.1. MATERIJALI

Uzorci su dio zbirke uzoraka posteljica koji pripadaju Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a koji su već prikupljeni iz baze KB Merkur u suradnji s doc.dr.sc. Anitom Škrtić, dr.med. Uzorke čine posteljice iz patoloških i zdravih trudnoća. Kontrolnu skupinu čine 9 terminskih posteljica iz trudnoća koje su protekle bez komplikacija i porođene su u terminu između 38-42. tjedna gestacije.

Unutar ispitivane skupine dobiveno je 15 posteljica s patologijom usporenog rasta koje su ušle u skupinu nazvanu idiopatski IUGR zbog činjenice da nije bilo dodatne patologije [11,50]

Kriteriji uključivanja u studiju su zastoj u rastu ploda otkriven serijskim UZV mjerenjima (najmanje 2) s procjenom tjelesne težine ispod 10. centile za dob trudnoće, spol ploda i paritet majke potvrđen mjerenjem rodne mase novorođenčeta na porodu.

Kriterij isključivanja iz studije za patološke trudnoće kao i za kontrole bili su: višeplodna trudnoća, pušenje majke, intrauterine virusne infekcije (TORCH, parvo 19), korioamnionitis, kronična hipertenzija, nakalemljena preeklampsija, autoimune bolesti majke.

6.2. METODE

6.2.1. Uzorkovanje posteljice

Posteljice u slučaju patološke trudnoće i posteljice iz skupine kontrola poslane su na patohistološku analizu. Svaku posteljicu pregledao je patolog i postavio dijagnozu (doc.dr.sc. A. Škrtić). Uzet je disk oko 5 cm od pupčane vrpce koji prolazi kroz cijelu debljinu posteljice, odnosno od fetalne do maternalne strane. Tkivo je zatim uklopljeno u parafinske blokove.

6.2.2. Imunohistokemijska analiza

Parafinski uklopljeni rezovi uzoraka debljine 4- μ m postavljeni su na silanizirana predmetna stakalca (DakoCytomation, Denmark). Rezovi su imunohistokemijski bojani metodom biotin–avidin–streptavidin peroksidazom iz hrena (engl. horseradish; DAKO No.K0679). Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju su poliklonalna protutijela DVL1 (eng. mouse monoclonal anti-human DVL1, klon: sc-8025, Santa Cruz Biotechnology, USA, razrjeđenje 1:100), DVL2 (mouse monoclonal anti-human DVL2, klon: sc-13974, Santa Cruz Biotechnology, USA, razrjeđenje 1:200) i DVL3 (mouse monoclonal anti-human DVL3, klon: sc-271295, Santa Cruz Biotechnology, USA, razrjeđenje 1:200).

6.2.3. Priprema za imunohistokemiju

Prije imunohistokemijskog bojanja potrebno je deparafinirati i rehidrirati tkivo što se postiže provođenjem uzoraka kroz niz ksilola u trajanju od dva puta po 5 minuta, apsolutnog i 96%-tnog alkohola u trajanju od dva puta po 3 minute, te vode u trajanju od 30 sekundi. Deparafinizirani i rehidrirani rezovi uzoraka zagrijavani su u otopini za otkrivanje antigena (Dako Target Retrieval Solution, Dako Corporation, USA) u mikrovalnoj pećnici 5 minuta na 800 W zbog demaskiranja epitopa. Preparati su zatim tretirani otopinom metanola i 3%-tnog H_2O_2 5 min, radi inaktivacije endogene peroksidaze. Slijedi ispiranje u PBS (engl. phosphate-buffered saline) puferu, te uklanjanje nespecifičnog vezanja s mišjim serumom u vlažnoj komori kroz 30 min na sobnoj temperaturi.

6.2.4. Imunohistokemijska obrada posteljica

Uzorci su nakon opisane pripreme tretirani optimalno razrijeđenim primarnim protutijelom (DVL1, DVL2, DVL3) 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorci su tri puta ispirani u PBS puferu. Za detekciju primarnog protutijela korišten je Dako REAL Envision detection system (DakoCytomation, Carpinteria, USA). Na kraju je cijeli proces vizualiziran, u trajanju od 10 minuta, supstrat-kromogen otopinom u kojoj kao supstrat služe koncentrirani Tris-HCl pufer i 0,8%-tna otopina vodikovog peroksida, a kao kromogen služi 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB). Navedena otopina isprana je destiliranom vodom. Primjena ovog supstrat-kromogen kompleksa rezultira nastajanjem netopivog smeđeg precipitata na antigenskom mjestu. Zatim je slijedilo kontrastiranje hemalaunom. Uzorci su 2 minute bojani u hemalaunu, koji se onda isprao destiliranom vodom. Nakon toga uzorci su 20 minuta ispirani u vodovodnoj i 5 minuta u destiliranoj vodi, te su dehidrirani provođenjem kroz niz rastućih koncentracija etilnog alkohola (96%EtOH, 100% EtOH) i ksilola u kojem se preparati izbistre. Obrada završava poklapanjem pokrovnim stakalcem i medijem za pokrivanje koji se koristi u rutinskoj histološkoj dijagnostici. Negativna kontrola bili su uzorci koje smo podvrgnuli istom postupku bojenja uz isključivanje inkubacije s primarnim antitijelom tijekom imunohistokemije.

6.2.5. Stereološka kvantitativna analiza

Sve posteljice analizirane su stereološkom metodom volumenske gustoće (V_v ; mm^0). Volumenska gustoća (V_v) je relativna stereološka varijabla koja pokazuje koliki dio sveukupnog prostora zauzima proučavana faza ili koliki je postotak proučavane faze u jedinici volumena (226). Volumenska gustoća (V_v) je izračunata prema formuli:

$$V_v = P_f/P_t$$

Pf = broj pogodaka testnih točaka na proučavanu fazu

Pt = broj svih testnih točaka unutar testnog polja

DVL1, DVL2 i DVL3 pozitivne stanice trofoblasta u bazalnoj decidui i resicama posteljice kvantificirane su Weiblovim mnogonamjenskim testnim sistemom s 42 testne točke. Za svaku analiziranu skupinu provedeno je preliminarno brojanje kako bi se odredio optimalan broj polja za analizu.

6.2.6. Statističke metode

Koristeći deskriptivnu statistiku, opisane su mjere centralne tendencije (medijan). Za statističku usporedbu ekspresije proteina DVL1, DVL2, DVL3 korišten je Mann-Whitneyev test. Priznata je kao značajna razlika na razini stupnja vjerojatnosti od $p < 0,05$. Podaci su obrađeni u programu GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

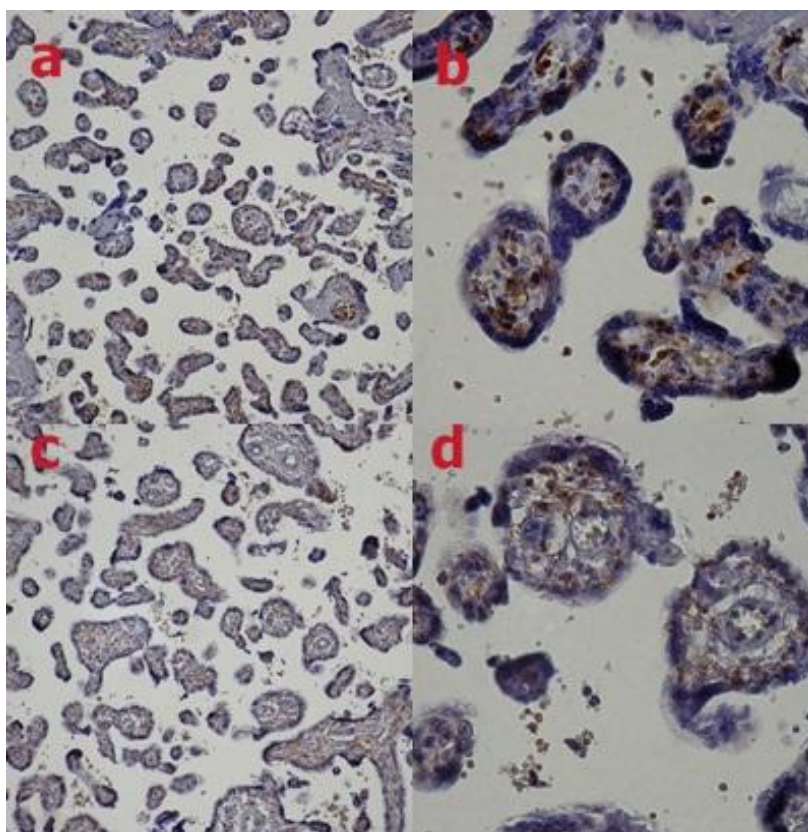
7. REZULTATI

Ekspresija proteina DVL1, DVL2, DVL3 istražena je u kontrolnim terminskim posteljicama i uspoređena s posteljicama iz terminskih patoloških trudnoća.

Ukupno je analizirano 24 posteljica. Rezultati su prikazani tablično.

7.1. EKSPRESIJA DVL1 PROTEINA

Na Slici 1 prikazana je ekspresija DVL1 proteina u patološkim IUGR posteljicama i kontrolnoj skupini terminskih posteljica. Protein DVL1 je prisutan u citoplazmi stanica trofoblasta kao i u citoplazmi stromalnih stanica placentarnih resica.



Slika 1: Imunohistokemijska ekspresija DVL1 proteina u posteljicama patoloških trudnoća s IUGR te kontrolnih skupina. a) kontrolna skupina (x10) b) kontrolna skupina (x40), c) IUGR (x10), d) IUGR (x40)

7.1.2 Usporedba ekspresije DVL1 u posteljicama s IUGR-om i kontrolnoj skupini terminskih posteljica

Statistički je značajno slabija ekspresija proteina DVL1 u posteljicama kod terminskog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR) u odnosu na kontrolu (tkivo posteljice iz trudnoće bez komplikacija) ($p < 0.0001$; Mann Whitney test) (Slika 2).

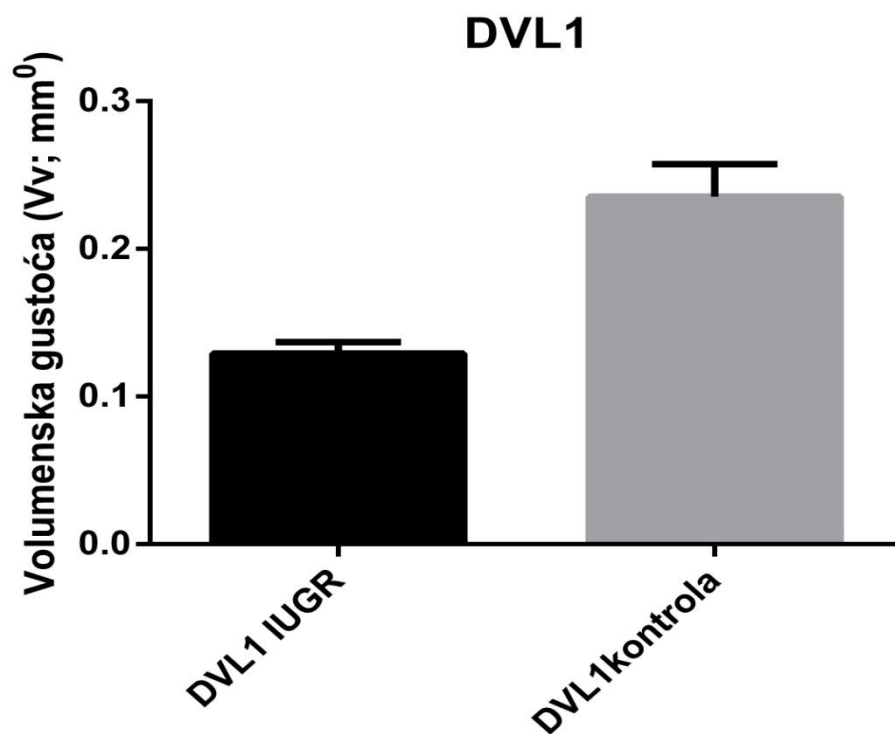
U Tablici 1 su prikazani rezultati kvantifikacije ekspresije volumenske gustoće DVL1 antigena u analiziranim posteljicama.

Tablica 1: Usporedba posteljica s IUGR-om i kontrolne skupine terminskih posteljica

Status	Br. uzoraka	Ekspresija DVL1
IUGR	15	0.1000
KONTROLA	9	0.2650
Ukupno	24	

Rezultati su prikazani kao medijan. Statistički značajna razlika između grupa ($p < 0,05$) analizirana je

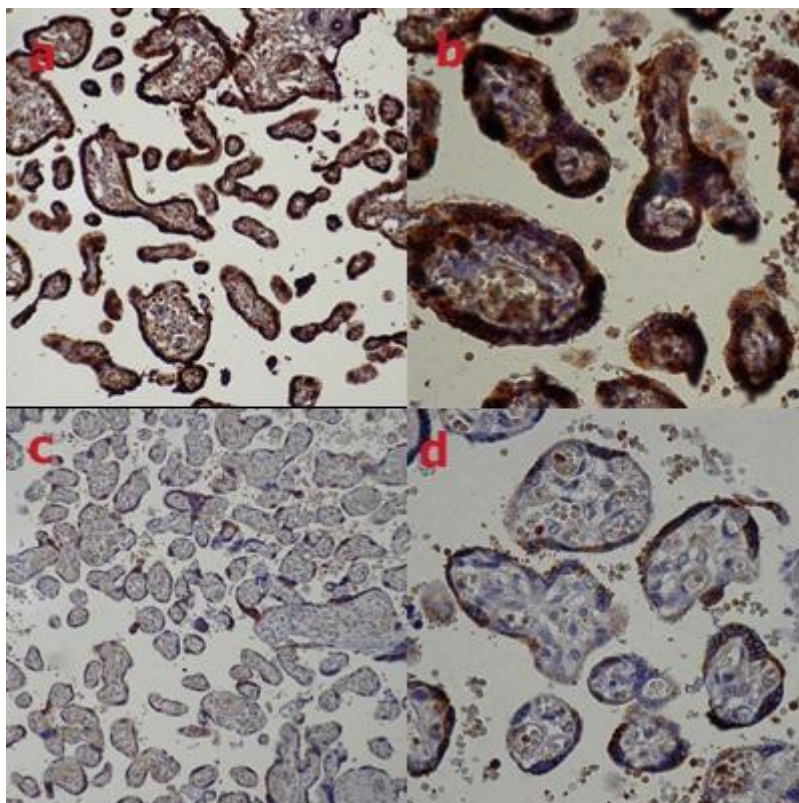
Mann Whitney testom.



Slika 2: Prikaz volumenske gustoće DVL1 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama kod terminskog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR) i u terminskim kontrolama.

7.2. EKSPRESIJA DVL2 PROTEINA

Na Slici 3 prikazana je ekspresija DVL2 proteina u patološkim IUGR posteljicama i kontrolnoj skupini terminskih posteljica. Protein DVL2 intenzivno boji citoplazme stanica sinciotrofoblasta u placentarnim resicama.



Slika 3: Imunohistokemijska ekspresija DVL2 proteina u posteljicama patoloških trudnoća s IUGR te kontrolnih skupina. a) kontrolna skupina (X10) b) kontrolna skupina (X40), c) IUGR (X10), d) IUGR (X40)

7.2.1. Usporedba ekspresije DVL2 u posteljicama s IUGR i kontrolnoj skupini terminskih posteljica

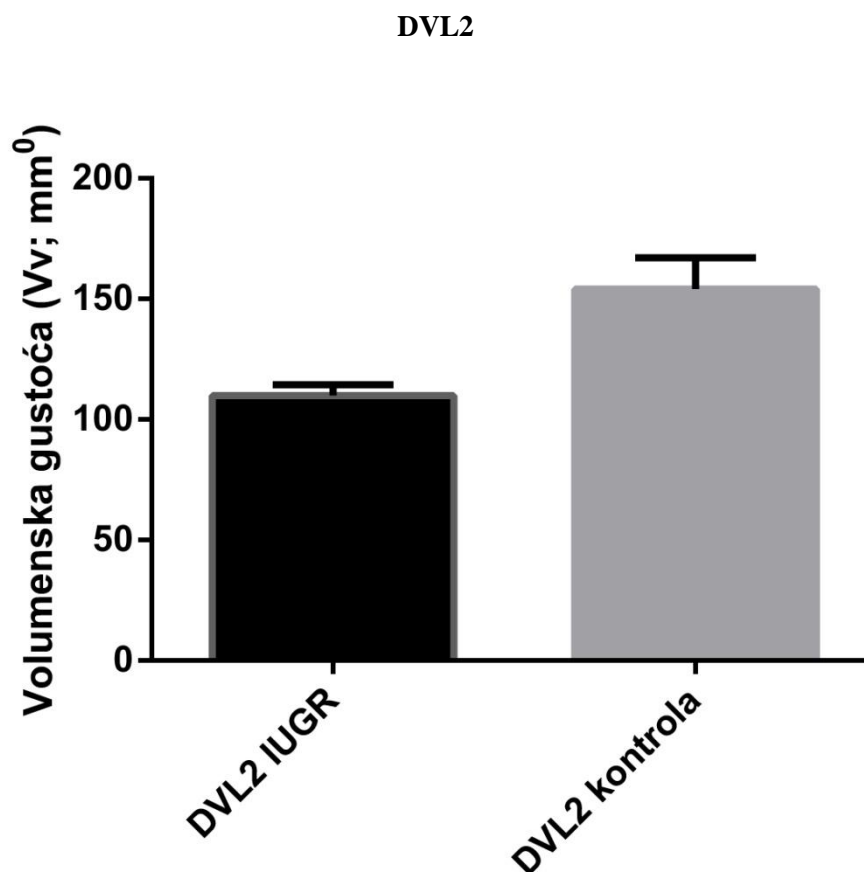
Statistički je značajno slabija ekspresija proteina DVL2 u posteljicama kod terminskog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR) u odnosu na kontrolu (tkivo posteljice iz trudnoće bez komplikacija) ($p=0.0029$; Mann Whitney test) (Slika 4).

U Tablici 2 su prikazani rezultati kvantifikacije ekspresije volumenske gustoće DVL2 antigena u analiziranim posteljicama.

Tablica 2: Usporedba posteljica s IUGR-om i kontrolne skupine terminskih posteljica

status	Br. uzoraka	Ekspresija DVL2
IUGR	15	0.1800
KONTROLA	9	0.2500
ukupno	24	

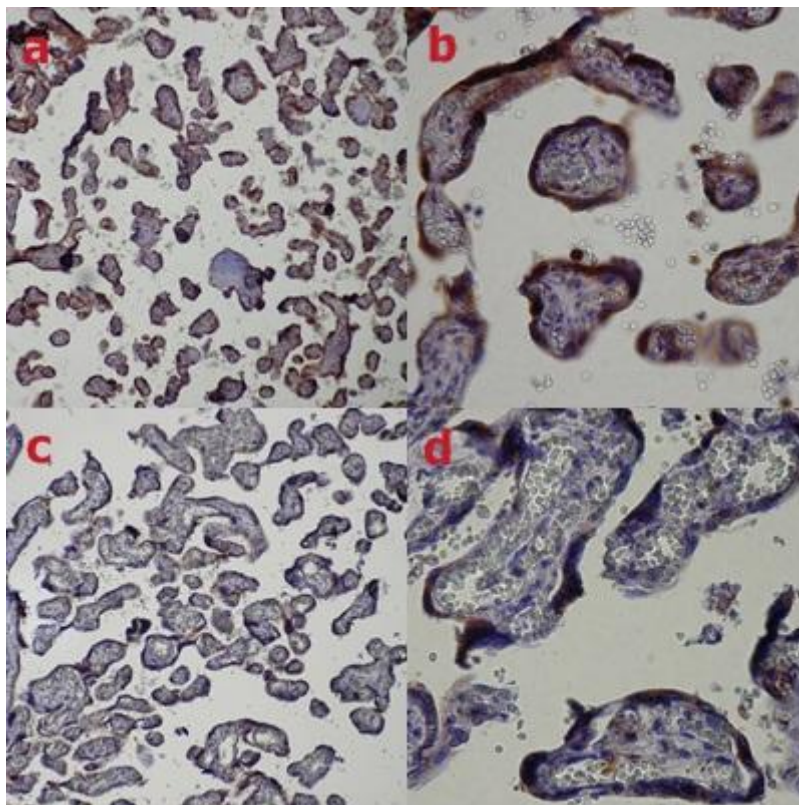
Rezultati su prikazani kao medijan. Statistički značajna razlika između grupa ($p < 0,05$) analizirana je Mann Whitney testom.



Slika 4: Prikaz volumenske gustoće DVL2 antigena (V_v , mm⁰) u posteljicama kod terminskog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR) i u terminskim kontrolama.

7.3. EKSPRESIJA DVL3 PROTEINA

Na Slici 5 prikazana je ekspresija DVL3 proteina u patološkim posteljicama sa IUGR i kontrolnoj skupini terminskih posteljica. Ekspresija proteina DVL3 prisutna je u citoplazmi stanica trofoblasta placentarnih resica.



Slika 5: Imunohistokemijska ekspresija DVL3 proteina u posteljicama patoloških trudnoća s IUGR te kontrolnih skupina. a) kontrolna skupina (X10) b) kontrolna skupina (X40), c) IUGR (X10), d) IUGR (X40).

7.3.1. Usporedba ekspresije DVL3 u posteljicama s IUGR i kontrolnoj skupini terminskih posteljica.

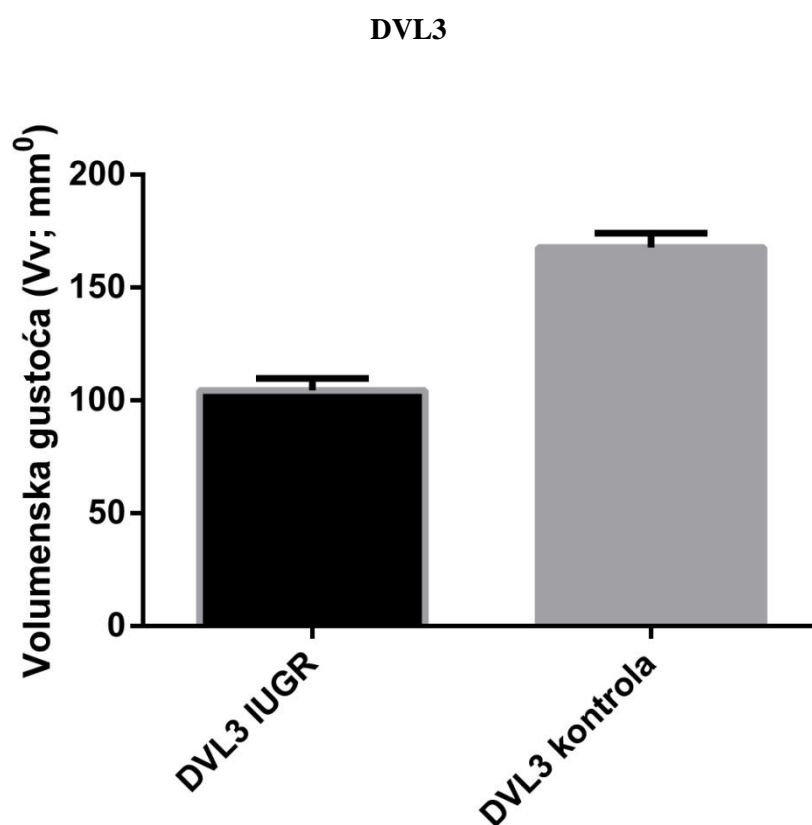
Statistički je značajno slabija ekspresija proteina DVL3 u posteljicama kod terminskog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR) u odnosu na kontrolu (tkivo posteljice iz trudnoće bez komplikacija) ($p < 0.0001$; Mann Whitney test) (Slika 6).

U Tablici 3 su prikazani rezultati kvantifikacije ekspresije volumenske gustoće DVL3 antigena u analiziranim posteljicama.

Tablica 3: Usporedba posteljica s IUGR-om i kontrolne skupine terminskih posteljica

status	Br. uzoraka	Ekspresija DVL3
IUGR	15	0.1600
KONTROLA	9	0.2400
ukupno	24	

Rezultati su prikazani kao medijan. Statistički značajna razlika između grupa ($p < 0,05$) analizirana je Mann Whitney testom.



Slika 6: Prikaz volumenske gustoće DVL3 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama kod termiskog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR) i u terminskim kontrolama.

7.4. USPOREDBA EKSPRESIJE DVL1, DVL2, DVL3 U POSTELJICAMA S IUGR-OM I KONTROLNOJ SKUPINI TERMINSKIH POSTELJICA

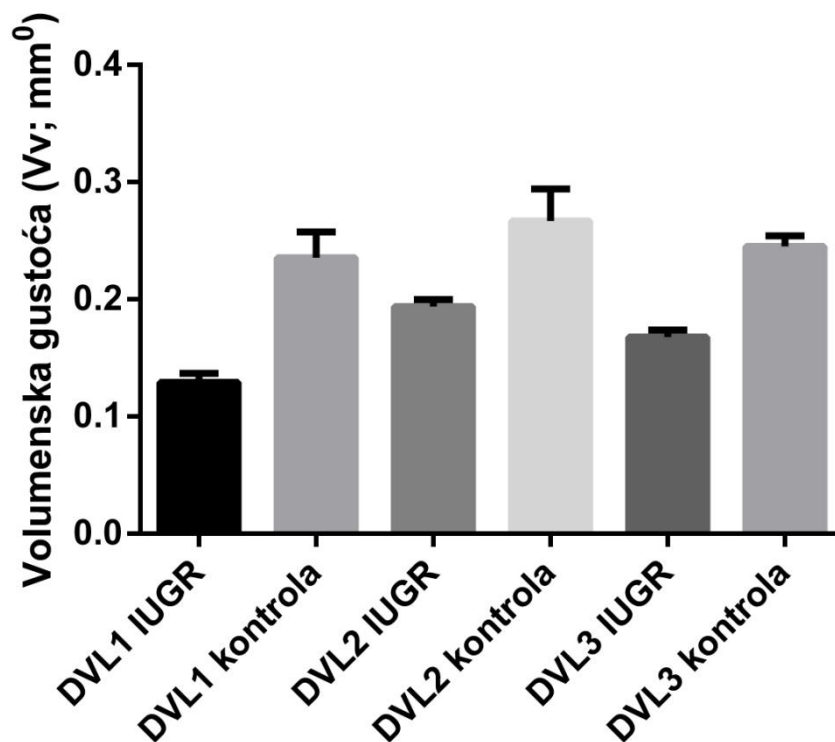
Statistički je značajno slabija ekspresija proteina DVL1, DVL2, DVL3 u posteljicama kod terminskog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR) u odnosu na kontrolu (tkivo posteljice iz trudnoće bez komplikacija). Također, ekspresija proteina kod terminskih idiopatskih posteljica sa zastojem u rastu ploda slijedi uzlazni niz: $DVL1 < DVL3 < DVL2$ ($p < 0.0001$; Mann Whitney test) (Slika 7). Između DVL1 i DVL2 kao i između DVL1 i DVL3 postoji statistički značajna razlika u ekspresiji između IUGR skupina ($p < 0.0001$; Mann Whitney test), no između DVL2 i DVL3 ta razlika, iako naizgled vidljiva, nije statistički značajna.

U Tablici 4 prikazani su rezultati kvantifikacije ekspresije volumenske gustoće DVL1, DVL2, DVL3 antigena u analiziranim posteljicama.

Tablica 4: Usporedba posteljica s IUGR-om i kontrolne skupine terminskih posteljica

status	Br. uzoraka	Ekspresija
IUGR DVL1	15	0.1000
Kontrola DVL1	9	0.2650
IUGR DVL2	15	0.1800
Kontrola DVL2	9	0.2500
IUGR DVL3	15	0.1600
Kontrola DVL3	9	0.2400
Ukupno	72	

Rezultati su prikazani kao medijan. Statistički značajna razlika između grupa ($p < 0,05$) analizirana je Mann Whitney testom.



Slika 7: Prikaz volumenske gustoće DVL1, DVL2, DVL3 antigena (Vv, mm⁰) u posteljicama kod termiskog idiopatskog zastoja u rastu ploda (IUGR) i u terminskim kontrolama.

8. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je analizirati ekspresiju proteina uključenih u diferencijaciju stanica trofoblasta u zdravim posteljicama te u posteljicama sa zastojem u rastu ploda (IUGR). Budući da se tijekom svoga razvoja posteljica mora kontinuirano prilagođavati zahtjevima koje joj postavlja rastući zametak/plod, stanice koje najviše doprinose toj adaptabilnosti, stanice trofoblasta, moraju biti pod stalnom kontrolom niza molekularnih mehanizama [51]. Jedan od takvih signalnih putova je upravo signalni put Wnt, a njegovi centralni medijatori su proteini obitelji *Dishevelld*. Ključni događaj placencije je epitelno-mezenhimna tranzicija (EMT) koja omogućuje intersticijsku i endovaskularnu invaziju stanica trofoblasta, ali i obratni proces mezenhimo-epitelne tranzicije koji doprinosi zaustavljanju invazije [52]. Pravovremeno odvijanje ovih procesa, preduvjet je uspješnoj placenciji te posljedično rođenju zdravog djeteta. Na temelju dosadašnjih istraživanja pretpostavili smo da će u tkivima sa slabije izraženom invazivnošću trofoblasta, dakle onima koja su rezultat neuspješne invazije decidue odnosno ležišta posteljice, prijenos signala Wnt signalnim putem biti smanjen zahvaljujući smanjenoj ekspresiji proteina DVL obitelji. Prema dosadašnjim spoznajama neuspješna invazija trofoblasta zapažena je u posteljicama fetusa sa zastojem u rastu i u hipertenzivnim poremećajima [53,54]. Rezultati ovog rada pokazuju statistički značajno smanjenu ekspresiju proteina DVL1, DVL2, DVL3 u terminskim IUGR posteljicama u odnosu na kontrolnu skupinu terminskih posteljica ($p < 0,05$, Mann Whitney test). Dobiveni rezultati u skladu su s onima drugih znanstvenika gdje su pozitivni regulatori invazije trofoblasta poput proteina SNAIL bili slabije izraženi [55], a negativni regulatori, poput proteina ELF5, jače [56]. Vrlo važni inhibitori Wnt signalnog puta poput proteina obitelji SFRP (engl. Secreted frizzled-related protein) također su izraženiji u IUGR posteljicama nego u kontrolnim zdravim trudnoćama što ukazuje na to da je regulacija invazije jedan od važnih čimbenika patologije trudnoće [57]. Iako danas postoji niz drugih teorija o nastanku IUGR-a, to ne znači da ova teorija smije biti zanemarena, već se znanstvena istraživanja trebaju provoditi paralelno na svim spoznajnim frontama. Poznavanje precizne kontrole invazivnih procesa ne doprinosi samo istraživanju patologije trudnoće, već i boljem razumijevanju takvih procesa u tumorskim tkivima [58]. Naime, tumorska

stanica ne otkiva ništa novo, ona samo koristi postojeće, uspavane ili manje aktivne signalne putove u krivo vrijeme i na krivom mjestu.

Možemo stoga zaključiti da je u uzorcima iz terminskih IUGR posteljica značajnije inhibiran prijenos signala Wnt signalnim putem, što može imati za posljedicu slabiju EMT ekstraviloznog trofoblasta. Manje invazivan trofoblast dovodi do površne invazije spiralnih arterija te posljedično do razvoja intrauterinog zastoja u rastu djeteta. Takvom ponašanje, moglo bi barem djelomično biti posljedica smanjene ekspresije proteina obitelji DVL što još jednom potvrđuje centralnu ulogu ovih proteina u regulaciji Wnt signalizacije.

9. ZAKLJUČCI

Analizom ekspresije triju važnih agonista Wnt signalnog puta, proteina DVL1, DVL2, DVL3 u posteljicama sa zaostojem u rastu ploda, došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Ekspresija DVL1 proteina u IUGR posteljicama značajno je snižena u odnosu na posteljice iz zdravih terminskih trudnoća.
2. Ekspresija DVL2 proteina u IUGR posteljicama značajno je snižena u odnosu na posteljice iz zdravih terminskih trudnoća.
3. Ekspresija DVL3 proteina u IUGR posteljicama značajno je snižena u odnosu na posteljice iz zdravih terminskih trudnoća.

10. ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ljiljani Šerman na uloženom trudu, stručnosti, strpljenju i podršci pri izradi ovog diplomskog rada kao i cjelokupnom školovanju na Medicinskom fakultetu.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci pruženoj tijekom studiranja.

11. LITERATURA

- [1] Dey N, Young B, Abramovitz M, Bouzyk M, Barwick B, et al. (2013) Differential Activation of Wnt- β -Catenin Pathway in Triple Negative Breast Cancer Increases MMP7 in a PTEN Dependent Manner. PLoS ONE 8(10): e77425. doi:10.1371/journal.pone.0077425
- [2] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signalling in development. Annu Rev Cell Dev Biol 1998;14:59-88
- [3] Karim R, Tse G, Putti T, Scolyer R, Lee S. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. Pathology 2004;36:120.
- [4] Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. Biochim Biophys Acta 2003;1653:1.
- [5] Miller JR. The Wnts. Genome Biol 2001;3. reviews3001.1
- [6] Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. J Cell Sci 2006;119:395e402.
- [7] Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. Cell Calcium 2005;38:439e46.
- [8] Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits betacatenin-TCF signaling depending on receptor context. PLoS Biol 2006; 4:e115
- [9] Komiya, Y., and Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68–75. doi: 10.4161/org.4.2.5851
- [10] Wang, Y. (2009). Wnt/planar cell polarity signaling : a new paradigm for cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* 8, 2103-2109. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0282
- [11] Almasry SM, Elfayomy AK. Morphometric analysis of terminal villi and gross morphological changes in the placentae of term idiopathic intrauterine growth restriction. Tissue Cell 2012; 44(4):214-9.

- [12] Saneyoshi,T.,Kume,S.,Amasaki, Y.,and Mikoshiba,K.(2002).The Wnt/calcium pathway activates NF- κ B and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* 417, 295–299. doi:10.1038/417295a
- [13] Ma,L.,and Wang,H.Y.(2006).Suppression of cyclic GMP-dependent protein kinase is essential to the Wnt/cGMP/Ca²⁺ pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 30990–31001. doi: 10.1074/jbc.M603603200
- [14] De, A.(2011).Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 43, 745–756. doi:10.1093/abbs/gmr079 Denicol,A.C.,Dobbs,K.B.,McLean
- [15] Ishitani,T.,and Ishitani,S.(2013). Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator. *Cell. Signal.* 25, 190–197. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.017
- [16] Ishitani,T.,Ninomiya-Tsuji,J.,Nagai, S., Nishita,M.,Meneghini,M., Barker,N.,etal.(1999).The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between β -catenin and transcription factor TCF. *Nature* 399, 798–802. doi: 10.1038/21674
- [17] Ikegawa S, Kumano Y, Okui K, Fujiwara T, Takahashi E, Nakamura Y. Isolation, characterization and chromosomal assignment of the human WNT7A gene. *Cytogenet Cell Genet* 1996;74:149e52.
- [18] Katoh M. Frequent up-regulation of WNT2 in primary gastric cancer and colorectal cancer. *Int J Oncol* 2001;19:1003e7.
- [19] Katoh M, Hirai M, Sugimura T, Terada M. Cloning, expression and chromosomal localization of Wnt-13, a novel member of the Wnt gene family. *Oncogene* 1996;13:873e6.
- [20] Saitoh T, Hirai M, Katoh M. Molecular cloning and characterization of WNT3A and WNT14 clustered in human chromosome 1q42 region. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:1168e75.
- [21] Saitoh T, Mine T, Katoh M. Frequent up-regulation of WNT5A mRNA in primary gastric cancer. *Int J Mol Med* 2002;9:515e9.
- [22] Tulac S, Nayak NR, Kao LC, Van Waes M, Huang J, Lobo S, et al. Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88: 3860e6.

- [23] Pollheimer J, Loregger T, Sonderegger S, Saleh L, Bauer S, Bilban M, et al. Activation of the canonical wingless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast. *Am J Pathol* 2006;168:1134e47.
- [24] C.Y. Logan, R. Nusse, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20 (2004) 781.
- [25] H. Clevers, *Cell* 127 (3) (2006) 469.
- [26] R.T. Moon, A.D. Kohn, G.V. De Ferrari, A. Kaykas, *Nat. Rev. Genet.* 5 (9) (2004) 691
- [27] J. Sussman, J. Klingensmith, P. Salinas, P.S. Adams, R. Nusse, N. Perrimon, *Dev. Biol.* 166 (1) (1994) 73.
- [28] N. Lijam, D.J. Sussman, *Genome Res.* 5 (2) (1995) 116.
- [29] J. Klingensmith, Y. Yang, J.D. Axelrod, D.R. Beier, N. Perrimon, D.J. Sussman, *Mech. Dev.* 58 (1–2) (1996) 15.
- [30] Y. Yang, N. Lijam, D.J. Sussman, M. Tsang, *Gene* 180 (1–2) (1996) 121.
- [31] M.V. Semenov, M. Snyder, *Genomics* 42 (2) (1997) 302
- [32] M. Boutros, M. Mlodzik, *Mech. Dev.* 83 (1–2) (1999) 27.
- [33] Jürgen Pollheimer, Thomas Loregger, Stefan Sonderegger, Leila Saleh, Sandra Bauer, Martin Bilban, Klaus Czerwenka, Peter Husslein, and Martin Knöfler: Activation of the Canonical Wingless/T-Cell Factor Signaling Pathway Promotes Invasive Differentiation of Human Trophoblast. *American Journal of Pathology, Vol. 168, No. 4, April 2006*
- [34]. Bischof P, Meisser A, Campana A: Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion—a review. *Placenta* 2000, 21(Suppl A):S55–S60
- [35]. Lala PK, Hamilton GS: Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. *Placenta* 1996, 17:545–555
- [36] Li HW, Tsao SW, Cheung AN: Current understandings of the molecular genetics of gestational trophoblastic diseases. *Placenta* 2002, 23:20–31

- [37] Hui P, Martel M, Parkash V: Gestational trophoblastic diseases: recent advances in histopathologic diagnosis and related genetic aspects. *Adv Anat Pathol* 2005, 12:116–125
- [38] Rosenberg A, editor. The IUGR newborn. *Seminars in perinatology*. Philadelphia, PA, USA: Elsevier; 2008
- [39] Mandruzzato G, Antsaklis A, Botet F, et al. Intrauterine restriction (IUGR). *J Perinat Med* 2008; 36:277–281.
- [40] Kuvačić I, Škrablin-Kučić S. ur. *Perinatologija danas*. Zagreb: Nakladni zavod Matice hrvatske; 2003
- [41] Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid programming. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1032:63-84
- [42] Serman L, Nikuseva Martić T, Serman A, Vranic S. Epigenetic alterations of the Wnt signaling pathway in cancer: a mini review. *Bosn J Basic Med Sci* 2014;14(4):191-4.
- [43] Hemberger M, Hughes M, Cross JC. Trophoblast stem cells differentiate in vitro into invasive trophoblast giant cells. *Dev Biol* 2004;271(2):362-71.
- [44] Serman L, Serman A, Fabijanovic D. An in vivo rat model to study epigenetic control of cell invasion. *Med Hypotheses* 2011;6:407-9.
- [45] Sonderegger S, Pollheimer J, Knöfler M. Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation - review. *Placenta* 2010;31:839-47.
- [46] Serman A, Serman L. Development of placenta in a rodent-model for human placentation. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011;3:233-39.
- [47] Parr BA, Cornish VA, Cybulsky MI, McMahon AP. Wnt7b regulates placental development in mice. *Dev Biol* 2001; 237:324-32
- [48] Ishikawa T, Tamai Y, Zorn AM i sur. Mouse Wnt receptor gene *Fzd5* is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development* 2001;128:25-33
- [49] Galceran J, Farinas I, Depew MJ, Clevers H, Grosschedl R. Wnt3a^{-/-} like phenotype and limb deficiency in *Lef1^{-/-} Tcf1^{-/-}* mice. *Genes Dev* 1999;13:709-17

- [50] Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements- a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:333-7
- [51] Glycosylation pattern and axin expression in normal and IUGR placentae. Vukasovic A, Grbesa D, Nikuseva Martic T, Kusec V, Miskovic B, Serman A, Soken N, Serman L. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015 Mar;28(5):558-63
- [52] Kokkinos MI, Murthi P, Wafai R, Thompson EW, Newgreen DF. Cadherins in the human placenta – epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development. *Placenta* 2010;31:747-55
- [53] Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997;99:2152-64
- [54] Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA i sur. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:648-55
- [55] Rac1/ β -Catenin Signalling Pathway Contributes to Trophoblast Cell Invasion by Targeting Snail and MMP9. Fan M, Xu Y, Hong F, Gao X, Xin G, Hong H, Dong L, Zhao X. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(4):1319-32
- [56] ELF5 transcription factor expression during gestation in humans and rats - an immunohistochemical analysis. Jurkovic I, Gecek I, Skrtic A, Zmijanac Partl J, Nikuseva Martic T, Serman A, Galesic Ljubanovic D, Serman L. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017 Jun;30(11):1261-1266.
- [57] Immunohistochemical expression of SFRP1 and SFRP3 proteins in normal and malignant reproductive tissues of rats and humans. Partl JZ, Fabijanovic D, Skrtic A, Vranic S, Martic TN, Serman L. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014 Oct;22(9):681-7.
- [58] Epigenetic control of cell invasion - the trophoblast model. Serman A, Simon F, Fabijanovic D, Serman L. *Biomol Concepts.* 2012 Dec;3(6):487-94.

12. ŽIVOTOPIS:

Rođena sam u Zagrebu 1992. godine gdje sam završila Osnovnu školu Silvije Strahimir Kranjčević. Paralelno sam pohađala dvije srednje škole, XV. matematičku gimnaziju u Zagrebu i Školu suvremenog plesa Ane Maletić. 2011.godine nakon položene državnu mature upisala sam se na Medicinski fakultet u Zagrebu na kojem sam redovni student.